

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390467

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞からセメント芽細胞への分化誘導と象牙質面へのセメント質形成誘導

研究課題名(英文) Induction of cementoblastic differentiation from mesenchymal stem cells and cementogenesis on dentin surface

研究代表者

栗原 英見 (KURIHARA, HIDEMI)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・教授

研究者番号：40161765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、歯周組織構成細胞の一つであるセメント芽細胞に特徴的に発現する遺伝子が明らかになり、セメント芽細胞分化に重要な役割を果たす遺伝子が特定された。さらに、これらの一部が、MSCのセメント芽細胞への分化に対して重要な役割を果たす可能性が示唆された。最終的には、MSCのセメント芽細胞への分化に対して特徴的な遺伝子の発現調整によって、効果的な歯周組織再生につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was clarified that characteristically expressed genes in cementoblasts were clarified and some genes, which can play an important role in cementoblast differentiation, were determined. Furthermore, it can be suggested that some of these genes play critical role in MSC differentiation to cementoblast. Finally, much more effective periodontal regeneration is expected by expression control for characteristic genes in cementoblast differentiation of MSC.

研究分野：歯周病学

キーワード：間葉系幹細胞 セメント芽細胞 歯周靭帯細胞 歯周組織再生 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

歯根部を取り囲む歯周組織を構成するセメント質と歯周靭帯は歯の生理的機能を発現する上で極めて重要な役割を担っているが、歯周炎の進行によって喪失する組織でもあり、歯周疾患の治療において、セメント質と歯周靭帯を再生することは歯周組織の構造および機能的再生においても最も重要であると考えられる。

歯周組織再生治療の研究は、局所に存在する細胞が有する組織再生能力を活性化する増殖因子を用いた“サイトカイン療法”と、

大きく複雑な歯周組織破壊に対応するための間葉系幹細胞(MSC)などを用いた“細胞治療”を中心に進行している。

私たちは、イヌを用いた MSC 移植による歯周組織再生の動物実験において歯根部象牙質面に新たにセメント質が形成されること、および移植した MSC がセメント芽細胞に分化することを示した(Hasegawa N, et al., J Periodontol. 2006)。一方、脳由来神経栄養因子(BDNF)の単回投与による歯周組織再生療法の動物実験において、BDNF 投与後1週間以内に象牙質と再生セメント質界面にOsteopontin 発現が観察され、セメント質の基質であり将来シャープピー繊維となる多量のコラーゲン繊維の形成が生じていた。また、セメント芽細胞がセメント質再生後の新生したセメント質上に均等に配列していることを示した(Takeda K, et al., Tissue Eng. 2005)。また、BDNF を含む神経栄養因子が歯の発生において重要な役割を果たしていることが知られている(Mitsiadis TA and Luukko K., Int J Dev Biol, 1995)。一方、酵素分画法によって歯周靭帯からセメント芽細胞を分離しhTERT を導入して確立したヒトセメント芽細胞株(HCEM-T)(Kitagawa M, et al., Bone.2005)がBDNF 刺激に対する応答を中心にin vitro で詳細に検討した(Kajiya M, et al., J Biol Chem. 2008)。

セメント芽細胞を特徴付けるタンパク質としては、Cementum-derived protein (CP-23) (Alvarez-Perez MA et al, Bone. 2006)、Cementum Protein 1 (CEMP1) (Carmona-Rodríguez B et al.,BBRC. 2007)、Cementum-derived attachment protein (CAP)、(Arzata et al. Bone Miner. 1992) F-spondin (Kitagawa M, et al., BBRC.2006)などが報告されているが、これらのタンパク質がセメント芽細胞の分化や骨芽細胞との違い、セメント質の再生にどのように関わっているのかは現在のところ明らかにされていない。

近年、iPS 細胞を経ずに、線維芽細胞から直接目的とする細胞(例えば Neuron cell)に細胞を転換できる可能性が示されている(Verbuchen T, et al. Nature. 2010)。これらの技術的進展の背景と私たちのこれまでの研究成果を融合し、MSC からセメント芽細胞を誘導する研究を計画した。また、線維芽細胞からの誘導のための基礎的なデータを獲得し、将来的に歯肉線維芽細胞からセメント芽細胞への転換を計画する。前述したように国内外においてセメント芽細胞を特徴付けるタンパク質についての研究があるが、MSC からセメント芽細胞を分化誘導する研究の報告は認められない。

これらのことより、セメント芽細胞への分化メカニズムを明らかにすることによって、MSC からセメント芽細胞への分化誘導方法を確立し、さらにはセメント質形成を誘導することでより効果的な歯周組織再生治療法を確立することが可能となると考える。

2. 研究の目的

歯周組織再生治療の中でも最も重要であり、かつ最も困難であるセメント質再生について、ex vivo におけるセメント質及び歯周靭帯の再生を目指して、本研究では、骨髄間葉系幹細胞(MSC)からセメント芽細胞への分化誘導法を確立することを研究の目的とする。MSC および歯周組織構成細胞である既存

のセメント芽細胞株、歯周靭帯細胞、歯肉線維芽細胞、骨芽細胞を、mRNA および micro RNA を中心として網羅的に遺伝子発現プロファイル进行分析してセメント芽細胞に特徴的な遺伝子を選定する。その後、選定した遺伝子を MSC に対して遺伝子導入によって遺伝子発現を調整し、セメント芽細胞を分化誘導に対する影響を検討しつつセメント芽細胞分化の効果的な方法を検討する。

一方で、既存のセメント芽細胞株を用いて象牙質上へのセメント質添加形成メカニズムについても解析する。

本研究で分化誘導したセメント芽細胞が確立されれば、確立したセメント芽細胞が実際に象牙質上にセメント質添加形成することを確認する。

具体的には、

- (1) これまでの in vitro の研究からセメント芽細胞を誘導出来ると予想される環境の中で目的とする細胞を培養し、ヒトセメント芽細胞株 (HCEM-T) とヒト骨髄間葉系幹細胞 (hMSC) の遺伝子プロファイルの比較分析を実施する
- (2) hMSC に対し、HCEM-T に特徴的な遺伝子の導入を行ない、hMSC の遺伝子発現を調整することによって hMSC をセメント芽細胞へ分化させること
- (3) 分化誘導されたセメント芽細胞による象牙質上へのセメント質形成および添加

を第一の目標とする。

最終的には、セメント芽細胞への転換を可能とするために重要な役割を果たす遺伝子を同定し、線維芽細胞を遺伝子導入によってセメント芽細胞に形質転換することで、より効果的な細胞を用いた歯周組織再生治療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) セメント芽細胞に特徴的な mRNA の網羅的解析

hMSC および歯周組織構成細胞を 72 時間培養し、それぞれの細胞に発現する mRNA を網羅的に解析し、セメント芽細胞に特徴的に発現する mRNA を検討した。

使用する細胞は、

- ヒト MSC (hMSC)
- ヒトセメント芽細胞株 (HCEM-T、hTERT を導入した細胞株)
- ヒト骨芽細胞株 (HOB)
- ヒト歯周靭帯線維芽細胞 (HPL cells)
- ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF)

mRNA の網羅的解析は、MSC の未分化マーカーとして知られている遺伝子、MSC の機能維持に関わるとされる遺伝子および各々の細胞の分化マーカーとして知られている遺伝子を抽出し、93 遺伝子の mRNA の発現解析を TaqMan Gene expression Assay custom plate (Applied Bioscience) を用いて網羅的におこなった。

(2) セメント芽細胞に特徴的な micro RNA の網羅的解析

hMSC および歯周組織構成細胞を 72 時間培養し、それぞれの細胞に発現する micro RNA を網羅的に解析し、セメント芽細胞に特徴的に発現する micro RNA を検討した。使用する細胞は、MSC, HCEM-T, NHOst, HPL cells および HGF を用い、培養は上記方法と同様におこなった。

micro RNA の網羅的解析は Applied Biosystem から提供されている一般的に機能が定義されている主要な 374 種の micro RNA の発現解析をおこなうことが可能な TaqMan® Array MicroRNA Card を用いて行なった。

(3) セメント芽細胞分化に特徴的な micro RNA の網羅的解析

MSC をセメント芽細胞への分化誘導因子を添加して 24 時間培養し、発現する

micro RNA を網羅的に解析することでセメント芽細胞分化に特徴的な micro RNA を検討した。

使用する細胞は hMSC を用い、ポジティブコントロールとして HCEM-T を用いた。セメント芽細胞分化誘導因子として、高いセメント芽細胞誘導能を有する BDNF (50 ng/mL) および臨床的に歯周組織再生に広く用いられているエムドゲインゲル® の主成分であるアメロジェニン (100 ng/mL) を用いた。

micro RNA の網羅的解析は、TaqMan® Array MicroRNA Card を用いておこなった。

(4) セメント芽細胞分化に対する micro RNA の影響

セメント芽細胞およびセメント芽細胞分化に特徴的な micro RNA のうち miR-210 を候補遺伝子として選択し、miR-210 の過剰発現または機能抑制をおこなうことによって、MSC のセメント芽細胞分化に対する影響を検討した。

micro RNA の過剰発現と機能抑制は、それぞれ *mirVana*® miRNA mimic と *mirVana*® miRNA inhibitor を Lipofectamine® RNAiMAX を用いて MSC に遺伝子導入することでおこない、0-24 時間培養することで検討した。

セメント芽細胞の分化マーカーとして、PTPLA, CEMP, F-spondin の発現を検討し、加えて、硬組織形成細胞への分化マーカーとして Runx2 および上記の実験で得られたセメント芽細胞分化に関連する MSC 未分化マーカー発現の検討をおこなった。

評価方法はリアルタイム PCR による mRNA レベルの検討をおこなった。

4. 研究成果

(1) セメント芽細胞に特徴的な mRNA の網羅的解析

未分化マーカー転写因子および関連遺伝子、骨・軟骨・脂肪・筋分化関連マ

ーカー、歯周靭帯細胞、歯肉線維芽細胞およびセメント芽細胞特異的遺伝子、MSC の未分化状態維持に關与する低酸素関連遺伝子の中から選定した遺伝子のプロファイル解析において、92 遺伝子中、HCEM-T にて特徴的な発現パターンを認めた遺伝子は 13 種類であり、そのうち、高発現を示した遺伝子は 7 種類、低発現を示した遺伝子は 6 種類であった。HOB、HGF および HPL cell でも特徴的な遺伝子発現パターンは確認され、HOB では高発現を示した遺伝子は 5 種類で低発現を示した遺伝子は 2 種類であった。さらに、HGF では低発現を示した遺伝子が 5 種類であり、HPL cell では高発現または低発現を示した遺伝子はそれぞれ 1 種類であった。

(2) セメント芽細胞に特徴的な micro RNA の網羅的解析

Micro RNA の網羅的解析において、374 種の micro RNA のうち、HCEM-T において発現が確認できた micro RNA は 204 種であり、このうち MSC よりも高発現を示した micro RNA は 24 種類であった。その中でも他の歯周組織構成細胞 (HPL cell, HGF, HOB) における発現パターンよりも特徴的な発現を示した micro RNA は 14 種類であり、高発現を示した micro RNA は 11 種類、低発現を示した micro RNA は 3 種類であった。また、HPL cell、HGF および HOB において、MSC での発現と比較して高発現を認めた micro RNA は、HPL cells では 24 種類の micro RNA、HGF では 14 種類の micro RNA、HOB では 6 種類の micro RNA であった。そのうち、低発現を示した micro RNA も含めて、特徴的な発現パターンを示した micro RNA は、HPL cell では 5 種類、HGF では 3 種類および HOB では 2 種類の micro RNA であった。

(3) セメント芽細胞分化に特徴的な micro RNA の網羅的解析

Micro RNA の網羅的解析において、374 種のうち、BDNF およびアメリロジェニンによって発現変化がみられた micro RNA は 116 種類であり、そのうち特徴的な発現パターンを示した micro RNA は 4 種類であった。その内訳は、上昇を示した micro RNA は 2 種類であり、減少を示した micro RNA は 2 種類であった。

セメント芽細胞に特徴的な micro RNA およびセメント芽細胞分化に特徴的な micro RNA のデータを検討した結果、最終的には、セメント芽細胞関連 micro RNA として、増加を示す micro RNA は 2 種類および減少を示す micro RNA は miR-210 を含む 4 種類の計 6 種類の micro RNA として選定をおこなった。

(4) セメント芽細胞分化に対する micro RNA の影響

セメント芽細胞に特徴的に発現する micro RNA のうち、MSC の未分化状態維持に関連しているとされる低酸素誘導性 micro RNA である miR-210 に着目し、MSC に対して、micro RNA の過剰発現または機能抑制をおこなった上で 24 時間培養した。

miR-210 の過剰発現によって、PTPLA および CEMP の mRNA 発現の初期抑制が確認されたが、F-spondin の発現は影響されなかった。また、Runx2 mRNA 発現は、初期段階での抑制が確認された。さらに、MSC 未分化マーカー転写因子の一つである ETV1 は、初期段階で mRNA 発現は抑制されたが 24 時間後には回復された。

一方、miR-210 の機能抑制により、セメント芽細胞の特異的マーカーとされる遺伝子のうち、F-Spondin および CEMP の mRNA 発現が促進されたが、PTPLA の mRNA 発現への影響は確認できなかった。さらに、硬組織形成細胞への分化に関与するとされる Runx2 の mRNA 発現は 12 時間で促進され、セメント芽細胞への分化誘導

時に発現が亢進する MSC 未分化マーカー転写因子 ETV1 の mRNA 発現は抑制された。

以上の結果により、セメント芽細胞への分化が他の細胞分化と同様にいくつかの micro RNA によって網羅的に制御されている可能性が示された。さらに、miR-210 以外の micro RNA および micro RNA の標的遺伝子に対する影響を検討することで、より詳細なセメント芽細胞分化のメカニズムが明らかになると考える。また、本研究課題によって明らかになった知見は、今後のセメント芽細胞分化およびセメント質再生法の確立に対して非常に重要ではあると考える。しかし、当該研究期間において、実際の臨床応用に対して必須であると思われる、セメント芽細胞分化への象牙質面の影響および象牙質表面へのセメント質添加形成に対する内容に関して、ほとんど検討されなかったため、今後の最重要課題として考慮する必要がある。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

- [雑誌論文](計2件)
- (1) Clumps of a mesenchymal stromal cell/extracellular matrix complex can be a novel tissue engineering therapy for bone regeneration.
Kittaka M, Kajiya M, Shiba H, Takewaki M, Takeshita K, Khung R, Fujita T, Iwata T, Nguyen TQ, Ouhara K, Takeda K, Fujita T, Kurihara H.
Cytotherapy. 2015 Mar 2.;
pii: S1465-3249(15)00048-1.
doi: 10.1016/j.jcyt.2015.01.007.
査読あり
 - (2) BDNF mimetic compound LM22A-4 regulates cementoblast differentiation via the TrkB-ERK/Akt signaling cascade.

Mikihito Kajiya, Kei Takeshita, Mizuho Kittaka, Shinji Matsuda, Kazuhisa Ouhara, Katsuhiro Takeda, Takashi Takata, Masae Kitagawa, Tsuyoshi Fujita, Hideki Shiba, Hidemi Kurihara
International Immunopharmacology 2014
April, 19(2), 245-52
doi: 10.1016/j.intimp.2014.01.028.

査読あり

〔学会発表〕(計7件)

- (1) 骨髄由来間葉系幹細胞のセメント芽細胞分化に及ぼす Wnt3a の影響
間 悠介, 栗原 英見, 加藤 功一
第 141 回日本歯科保存学会秋季学術大会
(2014 年 10 月 30-31 日, 山形)
- (2) microRNA は歯肉線維芽細胞由来液性因子による間葉系幹細胞の分化を制御する
兼田英里, 岩田倫幸, 石田 充, 高橋慶太, 永原隆吉, 藤田 剛, 柴 秀樹, 栗原英見
第 139 回日本歯科保存学会 2013 年度秋季学術大会 (2013 年 10 月 17-18 日, 秋田)
- (3) 骨髄間葉系幹細胞の培養および継代過程における機能的解析
石田 充, 岩田倫幸, 兼田英里, 高橋慶太, 柴 秀樹, 栗原英見
第 56 回秋季日本歯周病学会学術大会
(2013 年 9 月 22 日, 前橋)
- (4) 低分子 BDNF 模倣化合物 LM22A-4 は TrkB シグナルを介してセメント芽細胞の分化を制御する
加治屋 幹人, 柏井 圭, 竹下 慶, Nguyen Quon Trung, 北川 雅恵, 高田隆, 藤田 剛, 柴 秀樹, 栗原 英見
第 138 回日本歯科保存学会春季学術大会
(2013 年 6 月 27-28 日, 福岡)
- (5) Small molecule BDNF mimetic regulates cementoblast differentiation via TrkB signaling
Mikihito Kajiya, Hideki Shiba, Tsuyoshi Fujita, Kazuhisa Ouhara, Katsuhiro Takeda, Mizuho Kittaka, Takashi Takata, Masae

Kitagawa, Hidemi Kurihara

91st General Session & Exhibition of the IADR (2013 年 3 月 20-23 日, シアトル, アメリカ合衆国)

- (6) 間葉系幹細胞の多分化能維持に関する基礎的研究
石田 充, 岩田倫幸, 柴 秀樹, 兼田英里, 河口浩之, 栗原英見
第 22 回日本歯科医学会総会 (2012 年 11 月 9-11 日, 大阪)
- (7) 骨髄間葉系幹細胞の象牙質表面への接着
和田健志, 内田雄士, 上田 武, 河口浩之, 栗原英見
第 45 回広島大学歯学会総会 (2012 年 6 月 9 日, 広島)

6. 研究組織

- (1) 栗原 英見 (HIDEMI KURIHARA)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
(歯)・教授
研究者番号: 40161765
- (2) 研究分担者
加藤 功一 (KOUICHI KATO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
(歯)・教授
研究者番号: 50283875
水野 智仁 (NORIYOSHI MIZUNO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
(歯)・助教 研究者番号: 60325181
内田 雄士 (YUUSHI UCHIDA)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
(歯)・助教
研究者番号: 40363080
岩田 倫幸 (TOMOYUKI IWATA)
広島大学・病院・助教
研究者番号: 30418793
應原 一久 (KAZUHISA OUHARA)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院
(歯)・助教
研究者番号: 80550425
- (3) 連携研究者
該当者なし